

(Translation)

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

This is to certify that the annexed is a true copy of the
following application as filed with this Office.

Date of Application: October 29, 1999
Application Number: Japanese Patent Application
No. 309616/1999
Applicant(s): RIKEN

October 13, 2000

Commissioner,
Patent Office

Kozo Oikawa (seal)

Certificate No. 2000-3084613

1c813 U.S. PTO
09/697186
10/27/00

HY

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

JCE13 U.S. PRO
09/697186
10/27/00

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1 9 9 9 年 1 0 月 2 9 日

出 願 番 号

Application Number:

平成 1 1 年 特 許 願 第 3 0 9 6 1 6 号

出 願 人

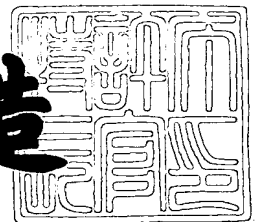
Applicant (s):

理化学研究所

2 0 0 0 年 1 0 月 1 3 日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

及 川 耕 造



出 証 番 号 出 証 特 2 0 0 0 - 3 0 8 4 6 1 3

【書類名】 特許願

【整理番号】 RJH11-072T

【提出日】 平成11年10月29日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明の名称】 変異型カナマイシンヌクレオチジルトランスフェラーゼ
及びこれを用いた好熱菌のスクリーニング方法

【請求項の数】 9

【発明者】

 【住所又は居所】 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 理化学研究所内

 【氏名】 横山 茂之

【発明者】

 【住所又は居所】 兵庫県西宮市高畑町 1 - 2 - 5 0 6

 【氏名】 寶関 淳

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府大阪市北区東天満 2 - 1 - 2 3 - 5 0 2

 【氏名】 矢野 貴人

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市吾妻 1 - 4 0 2 - 1 0 0 7

 【氏名】 小山 芳典

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府豊中市宮山町 2 - 1 6 - 4 1

 【氏名】 倉光 成紀

【発明者】

 【住所又は居所】 兵庫県西宮市甲子園口 2 - 2 7 - 1 6

 【氏名】 鏡山 博行

【特許出願人】

 【識別番号】 000006792

 【氏名又は名称】 理化学研究所

【代理人】

【識別番号】 100091096

【弁理士】

【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

【識別番号】 100096183

【弁理士】

【氏名又は名称】 石井 貞次

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9503608

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 変異型カナマイシンヌクレオチジルトランスフェラーゼ及びこれを用いた好熱菌のスクリーニング方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質に対して、Met57Leu、Ala62Val、Ser94Pro、Ser203Pro、Asp206Val、His207Gln、Ser220Pro、Ile234Val、及びThr238Alaからなる群から選択される 1 以上の点突然変異を有し、かつ熱安定性の向上した変異型カナマイシンヌクレオチジルトランスフェラーゼ。

【請求項 2】 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなることを特徴とする、熱安定性の向上した変異型カナマイシンヌクレオチジルトランスフェラーゼ。

【請求項 3】 配列番号 3 で表されるアミノ酸配列からなることを特徴とする、請求項 1 に記載の変異型カナマイシンヌクレオチジルトランスフェラーゼ。

【請求項 4】 請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載のカナマイシンヌクレオチジルトランスフェラーゼをコードするカナマイシンヌクレオチジルトランスフェラーゼ遺伝子。

【請求項 5】 請求項 4 に記載の遺伝子を含有するプラスミド。

【請求項 6】 請求項 5 に記載のプラスミドを含有する形質転換体。

【請求項 7】 請求項 4 に記載の遺伝子であることを特徴とする、好熱菌のための選択マーカー。

【請求項 8】 請求項 7 に記載の選択マーカーを使用することを特徴とする、好熱菌のスクリーニング方法。

【請求項 9】 好熱菌が *Thermus thermophilus* であることを特徴とする、請求項 8 に記載のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、熱安定性を顕著に向上させた新規なカナマイシンヌクレオチジルト

ランスフェラーゼ及びこれを利用した選択マーカー、並びに該選択マーカーを用いた *Thermus thermophilus* 等の好熱菌のスクリーニング方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

好熱菌は、そのタンパク質のバイオテクノロジーへの可能性ゆえに多くの関心を集めてきた。そのタンパク質は、極端な pH で安定であり、非好熱性タンパク質と比較して容易に結晶化し、取り扱いやすいゆえに、酵素の構造と機能の相関を研究する良い研究材料として有用である。しかしながら、好熱性のタンパク質は、大腸菌 (*Escherichia coli*) 中で発現したときに天然のコンフォメーションを再現しないことがある。これらのタンパク質は、標準の遺伝子工学ツールが利用できないため、好熱菌中で高温では発現されない。このことは、ゲノムプロジェクトから得られる配列データから推測できない機能の遺伝子をロックアウトし、次いで再導入することによりタンパク質の生物学的役割を調査する試みを阻害する。真正細菌 (Eubacterium) である *Thermus thermophilus* はその分子生物学が研究されている生物の中で最高温度 (50-82℃) で生育できる魅力ある生物である。

【0003】

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* の全ゲノムの配列解析は現在進行中である。全ゲノム配列研究は、日本 (HB8株) およびドイツ (HB27株) でまもなく完了する。ほかのゲノムプロジェクト同様、主な関心は配列そのものからポスト配列研究である機能あるいは構造ゲノミクスへ移行しつつある。

T. thermophilus のタンパク質の構造と生物学的機能を組織的に研究する計画がある。それゆえ、遺伝子工学的ツールの開発が可及的速やかに必要である。もっとも必須なツールは、使用が容易な選択マーカーである。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

これまで、*T. thermophilus* にはただ2つの選択システムが利用可能であった。1つのシステムは、栄養要求性の宿主が、それに相当する遺伝子を組み込んだプラスミドにより選択される方法である。しかし、栄養要求性のマーカーは、日常の

使用には便利ではない。なぜならば、選択培地の調製が厄介なことと、栄養的に制限されたプレート上での細胞の成育は、至適生育温度に於いてさえ遅いことによる。

もう1つのシステムは、60℃以下でのみ使えるカナマイシンヌクレオチジルトランスフェラーゼ (KNT) 遺伝子を利用することである。T. thermophilus は一般の抗生物質に感受性があるが、T. thermophilus に使える唯一の抗生物質耐性マーカーとして、黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus) KNT の変異型遺伝子がある。しかしながら、この変異型 KNT は、60℃ 以上で使えないので、選択マーカーとして理想から程遠いものである。至適生育温度 (70-75℃) からはるかに下のこの温度では、細胞成長は、非常に遅い。そこで、われわれは、KNT の熱安定性の改善に着手した。

【0005】

【課題を解決するための手段】

タンパク質の熱安定性改善を目的に多くの試みがなされた。ほとんどの試みは、タンパク質のフォールディングや構造形成の理解に基づく合理的デザインである。たとえば、ジスルフィド結合の導入や疎水性中心のパッキングの再配列やプロリンへの置換である。アミノ酸を置換して熱安定性が確保できるかどうか調べるために、好熱菌と非好熱菌の相同タンパク質の配列が比較された。他方では、タンパク質の熱安定性増加を目的に理性的でない方法が適用された。これらの研究のほとんどは、突然変異誘発、選択、選択した変異体の増幅、のラウンドを繰り返す、すなわち定方向進化の代わりに、ランダムな突然変異及びスクリーニングを1回行うものであった。僅か2〜3件の研究に於いて、定方向進化により成功裡に熱安定性が強化されたことが報告されている。

本発明者等は、T. thermophilus を生育温度の上限にむけた定方向進化 (directed evolution) に基づく戦略を用い、カナマイシン耐性遺伝子産物の温度安定性を生育温度の上限まで上げることに成功した。結果として得られた KNT は、T. thermophilus 等の好熱菌の便利な選択マーカーとなる。

【0006】

すなわち本発明は、以下の(1)〜(9)を提供するものである。

(1) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質に対して、Met57Leu、Ala62Val、Ser94Pro、Ser203Pro、Asp206Val、His207Gln、Ser220Pro、Ile234Val、及びThr238Alaからなる群から選択される 1 以上の点突然変異を有し、かつ熱安定性の向上した変異型カナマイシンヌクレオチジルトランスフェラーゼ。

(2) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなることを特徴とする、熱安定性の向上した変異型カナマイシンヌクレオチジルトランスフェラーゼ。

(3) 配列番号 3 で表されるアミノ酸配列からなることを特徴とする、上記 (1) に記載の変異型カナマイシンヌクレオチジルトランスフェラーゼ。

(4) 上記 (1) ~ (3) のいずれかに記載のカナマイシンヌクレオチジルトランスフェラーゼをコードするカナマイシンヌクレオチジルトランスフェラーゼ遺伝子。

【0007】

(5) 上記 (4) に記載の遺伝子を含有するプラスミド。

(6) 上記 (5) に記載のプラスミドを含有する形質転換体。

(7) 上記 (4) に記載の遺伝子であることを特徴とする、好熱菌のための選択マーカー。

(8) 上記 (7) に記載の選択マーカーを使用することを特徴とする、好熱菌のスクリーニング方法。

(9) 好熱菌が *Thermus thermophilus* であることを特徴とする、上記 (8) に記載のスクリーニング方法。

【0008】

本発明において、最も熱安定な変異株は、変異前のものと比較して 19 個のアミノ酸が置換していた。熱安定性は、20℃上昇したが、酵素活性自体に大きな変化は見られなかった。ほとんどの変異残基は、タンパク質分子の表面に存在し、面白いことに 19 置換のうち 5 個はプロリン残基への置換であった。進化したカナマイシン耐性遺伝子産物は、*T. thermophilus* の生育至適温度に於いて、選択マーカーとなりうる。このような便利な遺伝子工学ツールの開発は、*T. thermophilus* のポスト配列研究を促進するものとなろう。

【0009】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の実施の形態を説明するが、本発明は記載した形態のみに限定されるものではなく、本明細書の記載及び当分野で公知の技術に基づいて当業者が容易に修飾及び改変し得る技術については本発明の範囲内に含まれるものである。

尚、本明細書において、定方向進化とは、変異導入、選択、選択した変異体の増幅と、その変異体への更なる変異導入を繰り返すことにより、目的とする機能を向上させる手法をいう。

また、本明細書において、アミノ酸置換に対する記載、例えば「Met57Leu」は、野生型（本明細書においてはWT*）の57位のMetがLeuに置換していることを意味する。

更に、本明細書において「熱安定性の向上した」とは、野生型の酵素タンパク質が変性し、酵素活性が消失する高温条件下において、酵素活性が残存しているものをいう。

【0010】

培地

*T. thermophilus*細胞は、好ましくは0.4%トリプトン、0.2%酵母抽出物、0.1%NaCl(pH7.5)を含有する液体培地中で培養する。

*T. thermophilus*形質転換株の選択には、50 μ g/mlカナマイシンを含む3%寒天培地（70℃以下の場合）、500 μ g/mlカナマイシンを含む1.5%ゲランガム培地（gellan gum plate）（70℃以上の場合）を使用する。ゲランガムを固化させるために、2価の陽イオンである1.5mMのCaCl₂と1.5mMのMgCl₂を加える。これらのイオンはカナマイシンと拮抗するので、ゲランガム培地中のカナマイシン濃度は高くする。

【0011】

プラスミドpJHK1の構築

黄色ブドウ球菌の野生型KNTの塩基配列及びアミノ酸配列（配列番号10及び11）は、Nakanishi, Kら, J. Ferment. Technol. 54:801-807(1976)等から公知であり、これをコードするプラスミドとしてpUB110（3,000kDa、Lacey, R.W.

及びI.Chopra, J. Med. Microbiol., 7:285-297(1974)) 等がある。この野生型KNTに対し、2個の置換(Asp80TyrとThr130Lys)を有する変異体(WT*と称する、配列番号1)から定方向進化を開始する。WT*KNT遺伝子は、2つのプライマー(5'-プライマー、5'-GACTGTACGGGTACCCGTTGACGGCGGATATGGTA-3'(下線部はKpn I 部位、配列番号4)と3'-プライマー、5'-GACTGTACGCTGCAGCGTAACCAACATGATTAACA-3'(下線部はPst I 部位、配列番号5))を用いてpYK134(12.3kb、工業技術院生命工学研究所 小山芳典先生より)からPCRで増幅する。pYK134は、*T. thermophilus* HB8(東京薬科大学 大島泰郎先生より)から分離されたプラスミドpTT8に由来するもので、そのoriはBcII部位の近傍に位置している。pTT8(9.7kb)のサイズを小さくするために、BcII部位を含むKpnI-PstI断片(5.5kb)をゲルによって精製し、増幅したWT*遺伝子とライゲートさせる。得られたプラスミド、pJHK1(6.5kb)を定方向進化実験に用いる。上記pYK134、pTT8及びpJHK1の制限酵素地図を図1に示す。

【0012】

T. thermophilus HB27の形質転換

*T. thermophilus*は、好ましくは以下のようにして形質転換を行う。一夜培養したものを0.4mM CaCl_2 と0.4mM MgCl_2 を含む新しい培地で100分の1に希釈し、70℃で2時間振盪培養する。培養物(1×10^8 cells/ml)をプラスミド、例えばpJHK1と混合し、70℃で2時間、振盪しながらインキュベートし、カナマイシンを含む平板培地上に撒く。

【0013】

熱安定性KNT変異体の定方向進化

Stemmerらの論文(Stemmer, W.P.C.ら, Nature, 370, 389-391 (1994))に記載されているようにして、DNAシャフリングを実施する。実際には、目的とする遺伝子を含むDNAをDNaseIにより断片化し、100-300bpのDNA断片を回収する。そのDNA断片の混合物をプライマーなしでPCR増幅する。このとき、各断片間にオーバーラップする配列が存在するので、DNaseI処理前の全長DNAが再構成される。その全長DNAを5'と3'末端プライマーを用いて更にPCR増幅する。

【0014】

WT*遺伝子のコード領域は、上記で得られたpJHK1からPCRで増幅する。PCRに使用した5'-プライマーは、5'-GACTGTACGGAATTCGAGCTCGAGCAAATCTAAAA-3'（下線部はEcoRI部位、配列番号6）であり、3'-プライマーの配列は上記したとおりである（配列番号5）。シャッフルした断片を、EcoRIとPstIで切断し、精製し、同じ制限酵素で切断したpJHK1中に挿入する。それから、*T.thermophilus* HB27（工業技術院生命工学研究所 小山芳典先生より）を、このpJHK1誘導体（シャッフル断片挿入物）で形質転換する。形質転換体（ライブラリー）をカナマイシン含有プレート上で（64℃、36h）スクリーニングし、陽性コロニーをとり、カナマイシンプレート上に移し、64℃で40時間培養する。プレート上から細胞を滅菌水で取り上げ、プラスミドの混合物、pKT1 mixを作る。pKT1 mixから増幅した変異遺伝子をシャッフルし、1回目と同じ方法で2回目のスクリーニングを行う。すなわちシャッフルして得られたライブラリーを69℃で40時間培養し、再度陽性のコロニーを選択する。これをpKT2 mixと名づける。pKT3は、3回目のスクリーニングから得られた陽性コロニーから作成する。培養は79℃で20時間行う。*T.thermophilus* HB27をpKT3 mixで形質転換し、81℃、40時間培養した後、大きいほうから例えば20個のコロニーを取り上げ、培養し、プラスミド（pKT3-1-3-20とする）を調製する。おのおののプラスミドのコード領域を増幅し、pUC18（TAKARA）のKpnIおよびPstI部位にサブクローニングし、大腸菌で発現させる。大腸菌の培養溶解液を70℃で10分間加熱し、20個のKT3変異株間の残存KNT活性を比較する。最も高い残存活性を有する10個の変異株を選び、それらのコード領域の配列を決定する。

【0015】

KNTの発現と精製

発現プラスミドpUT7は、oriを含むpUC18のPvuII-ScaI断片とT7プロモーターを含むpET21b（Novagen社）のBglIII-ScaI断片を結合して構築する。KNTの発現に適したプラスミドとしては、上記pUT7の他、宿主細胞中で自立複製可能ないしは染色体中への組込みが可能で、KNT遺伝子を転写できる位置にプロモーターを含有しているものであれば良く、特に限定されるものではない。PCRで増幅した変異K

NT遺伝子は、pUT7のNdeIとXhoI部位にサブクローニングする。ここで使用するプライマーは：5'-プライマーは5'-GACTGTACGCATATGAATGGACCAATAATAATGAC-3' (WT*用、下線部はNdeI部位、配列番号7)及び5'-GACTGTACGCATATGAAAGGACCAATAATAATGAC-3' (KT3-11、HTK用、下線部はNdeI部位、配列番号8)、3'-プライマーは5'-GACTGTACGCTCGAGCGTAACCAACATGATTAACA-3' (下線部はXhoI部位、配列番号9)である。ここで、KNTの開始コドン、GTGからATGに変わっている。

【0016】

本発明において、KNT遺伝子を発現させるための宿主細胞としては、大腸菌等の細菌、酵母や動物細胞、昆虫細胞等が挙げられ、特に限定されるものではない。宿主細胞として大腸菌を使用する場合、得られる発現プラスミドを有する大腸菌BL21(DE3,pLysS)細胞は、1.0% ポリペプトン、0.5% 酵母抽出物、1.0% NaCl (pH7.0)、100 μ g/ml アンピシリン、1mM イソプロピル- β -D-ガラクトシドを含む培地中で37℃、一晚培養する。細胞を集め、50mM NaClと2mMのメルカプトエタノールを含む20mM Tris-HCl バッファー (pH7.5) に再懸濁し、超音波破碎する。以下の操作はすべて4℃で行う。遠心分離後の祖抽出液の上清を上記バッファーで平衡に達しているDEAE-トヨパールカラム (Tosoh) にかけて、50~250mMのNaCl 線状勾配下で溶出させる。各フラクションは、KNTアッセイとSDS-PAGEでチェックする。KNTを含むフラクションを集め、2mMの2-メルカプトエタノールを含む5mMのリン酸カリウムバッファー (pH7.0) に対して一晚透析した。透析液を、透析のバッファーで平衡化したヒドロキシアパタイトカラムにかけて、5~100mMのリン酸カリウムの線状勾配で溶出させた。KNTを含むフラクションを集め、限外濾過で濃縮する。次に、濃縮した溶液を0.1M KClを含む20mMのリン酸カリウムバッファー (pH7.0) で平衡化したセファクリルS-200カラム (Amersham Pharmacia Biotech社) 等にかけて酵素を精製する。酵素の純度は、SDS-PAGEで90%より大きくなるまでにする。

【0017】

KNT アッセイ

黄色ブドウ球菌KNTは、AMPのATPからカナマイシンの4'-ヒドロキシ基への転移を触媒する。酵素活性は、25℃で、50mM $MgCl_2$ と0.1-2mMカナマイシン、0.4-5.4

mM [$8-^{14}\text{C}$] ATP (0.4-4mCi/mmol) を含む 50mM Na-MES バッファー (pH6.0) 中で測定する。反応は、半量の 6N HCl を加えることにより停止し、PEI-セルロース TLC プレート上にスポットする。プレートは、1-プロパノール/ H_2O /酢酸=60:39:1 からなる溶媒で 45 分間展開する。生成物である、カナマイシン- $[^{14}\text{C}]$ AMP の放射能を Fujifilm phosphorimager BAS-2000 (富士フィルム社) で測定する。この系において、生成物の RF 値は 0.3 である。

【0018】

熱変性

熱変性曲線は、5mm 長のキュベット中で PTC-348WI 熱電温度管理システムを有する Jasco J-720WI spectropolarimeter (日本分光) にて 30-90°C (HTK には 30-95°C) の温度範囲で記録する。タンパク質濃度は、0.8 μM 、バッファーは、0.1 M KCl を含む 50mM のリン酸カリウム、pH7.0 である。サンプルの温度は、222nm でモニターしながら毎分 1°C の速さで上昇させた。

【0019】

【実施例】

以下、本発明を実施例を挙げて更に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

実施例 1 定方向進化

最初のスクリーニングは下記のごとく行った。先に手順を説明した DNA シャフリングにより、WT*遺伝子に変異が導入された。64°C にてスクリーニングされた 3.2×10^6 個の形質転換体から 431 個の陽性コロニーを取り上げた。最終的には、この陽性コロニーからプラスミドの混合物 pKT1 mix を調製した。pKT1 mix から増幅した変異 KNT 遺伝子が、新たな点突然変異を受け入れながら変異遺伝子を組み換えることを目的として、更に DNA シャフリングを行った。2 回目のスクリーニングは 69°C で (ライブラリーサイズ 4.8×10^6 、109 コロニーを選択)、3 回目は 79°C で実施した。(ライブラリーサイズ 2.4×10^5 、209 コロニーを選択) pKT3 mix で形質転換した *T. thermophilus* 細胞は、81°C でカナマイシンを含むプレート上でコロニーを形成した。しかし、宿主の *T. thermophilus* は 81°C より上の温度ではコロニーを形成できないので、4 回目のスクリーニングは不可能であ

った。

【 0 0 2 0 】

実施例 2 KT3変異株

81℃のスクリーニングにおいて大きなコロニーから得られた20株のKT3変異株の詳細を調べた。KT3変異株、KT3-1-3-20を大腸菌にて発現し、各変異株の熱安定性を、溶解液を70℃、10分加熱後の残存触媒活性から推定した。この分析に基づき、最も安定なKT3の10株を選択し、DNAの配列を決定した（KT3-1～KT3-19、表1参照）。

【 0 0 2 1 】

【表1】

表1 KNT変異株のアミノ酸置換

残基No.	2	17	25	57	61	62	66	75	91	94	102	112	116	117	159	188	190	196	197	198	199	203	206	207	211	220	234	238	246
WT*	N	H	D	M	E	A	H	V	Q	S	Q	S	L	E	T	S	S	V	K	Q	S	S	D	H	F	S	L	T	D
KT3-1								A	R	P	R	P	F					L									V	A	
KT3-3			N	L	G	V		A	R	P	R			G			L								L				N
KT3-5					G		Y	A	R	P	R										P						V		
KT3-7 S					G		Y	A	R	P	R	P	F				T			L							V		
KT3-11 K					G		Y	A	R	P	R	P	F								P				L				
KT3-12						T	Y	A	R	P	K	T	F		L	G		R			P	P						A	
KT3-13					G		Y	A	R	R	R	P	F								P		V	Q					
KT3-15					G		Y	A	R	R	R	P	F								P		V	Q					
KT3-16					G		Y	A	R	P	K	P									P		V	Q		P			
KT3-19				L			Y	A	R	P	K	P									P		V	Q					
HTK	K			L	G	V	Y	A	R	P	R	P	F								P	P	V	Q	L	P	V	A	

KT3-15は、KT3-13と同じミスセンス変異を有する。これら2個の変異体は、3個のサイレンと変異を共有するが、KT3-13の2個のサイレント変異とKT3-15の1個は、お互いにより独特である。それゆえ、これら2個の変異体は、別のクローンであると考えられる。

【 0 0 2 2 】

それぞれの変異株は約15個の点突然変異を有し、そのうち4-5個はサイレント変異である。高温でのスクリーニング後、KNT遺伝子のGC含量が増加する可能性があるが、39個のサイレント変異では、G及びC等の特定な傾向は見られなかった（データなし）。保存的置換であるVal75Ala置換は10個のKT3全てに見られた（表1）。別の保存的置換は、Glu61Glyが7変異株に、His66Tyrが8株、Gln91Argが9株、Ser112Proが7株、Ser199Proが7株である。すべての調べたKT3において、Gln102は、塩基性アミノ酸で置換されていた（7株はArgで、3株はLys）。興味深いことに、29置換のうち5個はプロリンへの置換であった。タンパク質の熱安定性を増加させるプロリン置換の多くの例が知られている。

10株のKT3の中で最も熱安定であったKT3-11を大腸菌で発現させ、精製した。精製したKT3-11（配列番号2）は、70℃、10分間の処理後活性であったが、75℃で完全に失活した（データ無し）。しかし、KT3-11を含有するプラスミドpKT3-11は、*T. thermophilus*の細胞を81℃で形質転換する。KT3-11は、細胞質中ではより熱安定性であるか、または迅速に発現してKNT活性を発揮する。

【 0 0 2 3 】

実施例 3 より熱安定な変異体の創作

実施例2の定方向進化は、3回のスクリーニングと選択で終了した。更なるスクリーニングが可能であったなら、KT3変異間の組換えにより、より熱安定な変異体を得られていたであろう。それゆえ、KT3-11の熱安定性をさらに改善するためにこの戦略を使った。別の2以上のKT3に保存された変異とプロリンへの変異を可能性ある変異として選択した。KT3変異の中でKT3-3は独特なので（表1）、KT3-11にはないが、KT3-3にある変異も選択した。これらの変異は、Amersham社のキット（Sculptor（登録商標））により、独立してKT3-11に付け加えられた。おのこのKT3-11の単一変異株を大腸菌で発現させ、おのこの変異株の粗溶解物の熱安定性を、KT3-11と比較した。表2に結果を示すように、以下の9個の置換がKT3-11の熱安定性を改善した。Met57Leu、Ala62Val、Ser94Pro、Ser203Pro、Asp206Val、His207Gln、Ser220Pro、Ile234Val、Thr238Ala。

【 0 0 2 4 】

【表 2】

表 2 KT3-11 変異株の相対残存活性

KT3-11 変異株	相対残存活性	
	7 0℃	7 5℃
KT3-11	1.0	1.0
D25N	0.1	—
M57L	11	—
A62V	8.3	—
S94P	2.3	—
E117G	0.1	—
S190L	0.1	—
S203P	1.9	—
D206V+H207Q	2.5	—
S220P	1.3	—
I234V	2.2	—
T238A	5.5	—
A62V+S94P	32	1.9
A62V+S94P+M57L+T238A	—	14
A62V+S94P+M57L+T238A+D206V+H207Q+S220P+I234A	—	93
A62V+S94P+M57L+T238A+D206V+H207Q+S220P+I234A+S203P	—	113

(数値は、これらの変異体を発現させた大腸菌 BL21(pLysS)株溶菌液における 7 0℃または7 5℃で1 0 分間熱処理した後の相対残存活性を示す)

【0 0 2 5】

一方、KT3-3に独特の3個の変異である Asp25Asn、Glu117Gly、Ser190Leuは、KT 3-11の配列との関連においては、少なくとも不安定化に働いている(表2 参照)。「高度に熱安定性なカナマイシンヌクレオチジルトランスフェラーゼ」(high ly thermostable kanamycin nucleotidyltransferase: HTK、配列番号3)は、Amersham社のキット(Sculpter(登録商標))により、すべての9個の陽性変異をKT3-11に組み込むことにより作られた(表1)。HTKはWT*と比較して19個のアミノ酸の置換を有する。HTKを作成する途中に、これらの変異の熱安定性への効果は、ほぼ付加的なものであることが観察された(表2 参照)。HTKのATP (2mM カナマイシン条件下)に対するKcat、Km値は、WT*の約2倍であるが、HTKの触媒としての性質は変異によりほとんど変化していない(表3)。

【0 0 2 6】

【表 3】

表3. KNT変異体の動力学的パラメーター

酵素	ATP=5.4mM		Kan=2.0mM	
	Km,kan(mM)	Kcat(min ⁻¹)	Km,ATP(mM)	Kcat(min ⁻¹)
WT*	0.46±0.31	13±2.6	2.7±0.52	12±1.1
HTK	0.59±0.21	18±2.3	5.9±2.6	24±6.7

酵素活性は、25℃、pH6.0で測定。1つの基質に対する動力学的パラメーターは、別の基質の濃度を一定にして求めた。

Kan、カナマイシン

【0027】

実施例 4 3種のKNTの熱安定性

WT*、KT3-11、HTKの熱安定性を評価するために、おのこのタンパク質の熱変性をCD spectroscopyで追跡した（図2A）。WT*、KT3-11、HTKのみかけのT_m値は、それぞれ、61、73、84℃である。KNTの変性は非可逆であり、KT3-11とHTKは、変性後凝集するので、図2Aの変性曲線は、ΔΔG値を計算するには使えない。3種のKNTの相対的安定性を確かめるために、60、72、80℃で10分間熱処理後、各KNTの残存活性を測定した（図2B）。60℃では、WT*の活性は5%に低下したが、KT3-11とHTKでは変わらなかった。72℃では、WT*は完全に不活化したが、KT3-11の活性は5%に下がり、HTKはまだ活性であった。HTKは、80℃、10分間の熱処理後でさえも15%の活性を保有した。この結果は、変性曲線から得られたT_m値によく合致した。HTKの熱安定性は、WT*のそれと比較して少なくとも20℃上昇したといっても良い。WT*は、上記のように2個の変異を有し、野生型のKNTと比較して熱安定性が約10℃上昇している。それゆえ、HTKの熱安定性は、黄色ブドウ球菌の野生型酵素に21個の置換を導入することにより合計30℃上昇したこととなる。本発明者等の知る限り、タンパク質の熱安定性を改善するプロジェクトの中で、本発明はもっとも大きな成功例といえる。グルコースデヒドロゲナーゼとイソ-1-シトクロムの熱安定性は、それぞれ20℃と17℃上昇したが（Makino, Y., J. Biochem. 264, 6381-6385 (1989); Nagao, T., FEBS Lett. 253, 113-116 (1989); Das, G., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 496-499 (1989)）、いずれの場合も1個のアミノ酸の置換によるものである。これらの2個の例は興味深いが、われわれのKNTのアプローチがより一般的であるだろう。天然のタンパク質の進化は、多くの変異の累積により進行すると思われるが、それぞれの変異は全体

の効果に小さな貢献を与える。小さな効果の蓄積が重要であるという概念は、少数の合理的に設計された置換が導入されている多くの研究に於いて、ごく限られた成功に終わっているという事実が支持している。ここに明記すべきことは、熱安定なKNT変異株を1回のランダム変異とスクリーニングにより分離する2個の独立した研究が、ただ2個の同一の安定変異を見出したことである。

【0028】

実施例 5 KNT構造における変異残基の分布

疎水性コアに存在するVal75とIle234を除き、HTKのすべてのほかの変異は、分子の表面上に存在する(図3)。サブユニットの界面には、変異残基はない。Gln91Arg置換は、おそらくヘリックス双極子を安定化している。タンパク質の熱安定性は、プロリン置換により上昇することが報告されている。HTKでは、5個のプロリン置換があった。Ser94とSer112は、 β -ターンの第2部位にあり、Ser199とSer203は、表面のループ上に、Ser220は α -ヘリックスのN-末端cap構造にある。驚くべきことは、Ser94側鎖の水酸基は、カナマイシンの1-アミド基から水素結合の距離にあるにもかかわらず、HTKの触媒効率は、Ser94Proの変異にもかかわらず、ほとんど変化していない。

【0029】

実施例 6 *T. thermophilus*用の便利なベクターの創作

*T. thermophilus*の複製起源とHTK遺伝子を組み込んでいるプラスミド、pJHK3(図4に制限酵素地図を示す)は、*T. thermophilus*の分子生物学実験を行うのに便利なベクターである。pJHK3を使用すると、形質転換とコロニー取り上げから液体培養までの標準操作を2日間で完了することができるが、従来のWT*遺伝子を用いた同じプロトコルでは、4日間を必要とする。本発明に係るこの新しい選択マーカーにより、*T. thermophilus*や、*Thermus aquaticus*、*Bacillus stearothermophilus*等の他の好熱細菌の将来の研究が大いに加速される。

【0030】

【発明の効果】

以上詳述した如く、本発明によって、熱安定性を顕著に向上させた新規なカナマイシンヌクレオチジルトランスフェラーゼ及びこれを利用した選択マーカー、

並びに該選択マーカーを用いた *Thermus thermophilus* 等の好熱菌のスクリーニング方法が提供される。

本発明に係るこの新しい選択マーカーにより、*T. thermophilus* や、*Thermus aquaticus*、*Bacillus stearothermophilus* 等の好熱細菌の将来の研究が大いに加速される。

【 0 0 3 1 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> The Institute of Physical and Chemical Reserch

<120> Thermostable kanamycin nucleotidyltransferase and
screening method of thermophiles using thereof

<130> RJH11-072T

<160> 11

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 253

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant enzyme obtained by introduction of point mutation i
nto wild type KNT gene and its expression

<400> 1

Met Asn Gly Pro Ile Ile Met Thr Arg Glu Glu Arg Met Lys Ile Val

1 5 10 15

His Glu Ile Lys Glu Arg Ile Leu Asp Lys Tyr Gly Asp Asp Val Lys

20 25 30

Ala Ile Gly Val Tyr Gly Ser Leu Gly Arg Gln Thr Asp Gly Pro Tyr

35 40 45

Ser Asp Ile Glu Met Met Cys Val Met Ser Thr Glu Glu Ala Glu Phe

50 55 60

Ser His Glu Trp Thr Thr Gly Glu Trp Lys Val Glu Val Asn Phe Tyr

65 70 75 80

Ser Glu Glu Ile Leu Leu Asp Tyr Ala Ser Gln Val Glu Ser Asp Trp

85 90 95

Pro Leu Thr His Gly Gln Phe Phe Ser Ile Leu Pro Ile Tyr Asp Ser

100 105 110

Gly Gly Tyr Leu Glu Lys Val Tyr Gln Thr Ala Lys Ser Val Glu Ala

115 120 125

Gln Lys Phe His Asp Ala Ile Cys Ala Leu Ile Val Glu Glu Leu Phe

130 135 140

Glu Tyr Ala Gly Lys Trp Arg Asn Ile Arg Val Gln Gly Pro Thr Thr

145	150	155	160
Phe Leu Pro Ser Leu Thr Val Gln Val Ala Met Ala Gly Ala Met Leu			
165	170	175	
Ile Gly Leu His His Arg Ile Cys Tyr Thr Thr Ser Ala Ser Val Leu			
180	185	190	
Thr Glu Ala Val Lys Gln Ser Asp Leu Pro Ser Gly Tyr Asp His Leu			
195	200	205	
Cys Gln Phe Val Met Ser Gly Gln Leu Ser Asp Ser Glu Lys Leu Leu			
210	215	220	
Glu Ser Leu Glu Asn Phe Trp Asn Gly Ile Gln Glu Trp Thr Glu Arg			
225	230	235	240
His Gly Tyr Ile Val Asp Val Ser Lys Arg Ile Pro Phe			
245	250		

<210> 2

<211> 253

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant enzyme obtained by introduction of point mutation into wild type KNT gene and its expression

<400> 2

Met Lys Gly Pro Ile Ile Met Thr Arg Glu Glu Arg Met Lys Ile Val

1 5 10 15

His Glu Ile Lys Glu Arg Ile Leu Asp Lys Tyr Gly Asp Asp Val Lys

20 25 30

Ala Ile Gly Val Tyr Gly Ser Leu Gly Arg Gln Thr Asp Gly Pro Tyr

35 40 45

Ser Asp Ile Glu Met Met Cys Val Met Ser Thr Glu Gly Ala Glu Phe

50 55 60

Ser Tyr Glu Trp Thr Thr Gly Glu Trp Lys Ala Glu Val Asn Phe Tyr

65 70 75 80

Ser Glu Glu Ile Leu Leu Asp Tyr Ala Ser Arg Val Glu Ser Asp Trp

85 90 95

Pro Leu Thr His Gly Arg Phe Phe Ser Ile Leu Pro Ile Tyr Asp Pro

100 105 110

Gly Gly Tyr Phe Glu Lys Val Tyr Gln Thr Ala Lys Ser Val Glu Ala

115 120 125

Gln Lys Phe His Asp Ala Ile Cys Ala Leu Ile Val Glu Glu Leu Phe

130 135 140

Glu Tyr Ala Gly Lys Trp Arg Asn Ile Arg Val Gln Gly Pro Thr Thr

145 150 155 160

Phe Leu Pro Ser Leu Thr Val Gln Val Ala Met Ala Gly Ala Met Leu

165 170 175

Ile Gly Leu His His Arg Ile Cys Tyr Thr Thr Ser Ala Ser Val Leu

180 185 190

Thr Glu Ala Val Lys Gln Pro Asp Leu Pro Ser Gly Tyr Asp His Leu

195 200 205

Cys Gln Leu Val Met Ser Gly Gln Leu Ser Asp Ser Glu Lys Leu Leu

210 215 220

Glu Ser Leu Glu Asn Phe Trp Asn Gly Ile Gln Glu Trp Thr Glu Arg

225 230 235 240

His Gly Tyr Ile Val Asp Val Ser Lys Arg Ile Pro Phe

245 250

<210> 3

<211> 253

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant enzyme obtained by introduction of point mutation i
nto wild type KNT gene and its expression

<400> 3

Met Lys Gly Pro Ile Ile Met Thr Arg Glu Glu Arg Met Lys Ile Val

1 5 10 15

His Glu Ile Lys Glu Arg Ile Leu Asp Lys Tyr Gly Asp Asp Val Lys

20 25 30

Ala Ile Gly Val Tyr Gly Ser Leu Gly Arg Gln Thr Asp Gly Pro Tyr

35 40 45

Ser Asp Ile Glu Met Met Cys Val Leu Ser Thr Glu Gly Val Glu Phe

50 55 60

Ser Tyr Glu Trp Thr Thr Gly Glu Trp Lys Ala Glu Val Asn Phe Tyr

65 70 75 80

Ser Glu Glu Ile Leu Leu Asp Tyr Ala Ser Arg Val Glu Pro Asp Trp

85 90 95

Pro Leu Thr His Gly Arg Phe Phe Ser Ile Leu Pro Ile Tyr Asp Pro

100 105 110

Gly Gly Tyr Phe Glu Lys Val Tyr Gln Thr Ala Lys Ser Val Glu Ala

115 120 125

Gln Lys Phe His Asp Ala Ile Cys Ala Leu Ile Val Glu Glu Leu Phe

130 135 140

Glu Tyr Ala Gly Lys Trp Arg Asn Ile Arg Val Gln Gly Pro Thr Thr

145 150 155 160

Phe Leu Pro Ser Leu Thr Val Gln Val Ala Met Ala Gly Ala Met Leu

165 170 175

Ile Gly Leu His His Arg Ile Cys Tyr Thr Thr Ser Ala Ser Val Leu

180 185 190

Thr Glu Ala Val Lys Gln Pro Asp Leu Pro Pro Gly Tyr Val Gln Leu

195 200 205

Cys Gln Leu Val Met Ser Gly Gln Leu Ser Asp Pro Glu Lys Leu Leu

210 215 220

Glu Ser Leu Glu Asn Phe Trp Asn Gly Val Gln Glu Trp Ala Glu Arg

225 230 235 240

His Gly Tyr Ile Val Asp Val Ser Lys Arg Ile Pro Phe

245 250

<210> 4

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:5'-Primer for PCR amplification

<400> 4

gactgtacgg gtacccgttg acggcggata tggta

35

<210> 5

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3'-Primer for PCR amplification

<400> 5

gactgtacgc tgcagcgtaa ccaacatgat taaca

35

<210> 6

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5'-Primer for PCR amplification

<400> 6

gactgtacgg aattcgagct cgagcaaata taaaa

35

<210> 7

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:5'-Primer for subcloning of
WT*

<400> 7

gactgtacgc atatgaatgg accaataata atgac

35

<210> 8

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:5'-Primer for subcloning of
KT3-11 and HTK

<400> 8

gactgtacgc atatgaaagg accaataata atgac

35

<210> 9

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:3'-Primer for subcloning

<400> 9

gactgtacgc tcgagcgtaa ccaacatgat taaca

35

<210> 10

<211> 759

<212> DNA

<213> Staphylococcus aureus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(759)

<400> 10

gtg aat gga cca ata ata atg act aga gaa gaa aga atg aag att gtt 48

Met Asn Gly Pro Ile Ile Met Thr Arg Glu Glu Arg Met Lys Ile Val

1

5

10

15

cat gaa att aag gaa cga ata ttg gat aaa tat ggg gat gat gtt aag 96

His Glu Ile Lys Glu Arg Ile Leu Asp Lys Tyr Gly Asp Asp Val Lys

20

25

30

gct att ggt gtt tat ggc tct ctt ggt cgt cag act gat ggg ccc tat 144

Ala Ile Gly Val Tyr Gly Ser Leu Gly Arg Gln Thr Asp Gly Pro Tyr

35

40

45

tcg gat att gag atg atg tgt gtc atg tca aca gag gaa gca gag ttc 192

Ser Asp Ile Glu Met Met Cys Val Met Ser Thr Glu Glu Ala Glu Phe

50

55

60

agc cat gaa tgg aca acc ggt gag tgg aag gtg gaa gtg aat ttt gat 240
Ser His Glu Trp Thr Thr Gly Glu Trp Lys Val Glu Val Asn Phe Asp
65 70 75 80

agc gaa gag att cta cta gat tat gca tct cag gtg gaa tca gat tgg 288
Ser Glu Glu Ile Leu Leu Asp Tyr Ala Ser Gln Val Glu Ser Asp Trp
85 90 95

ccg ctt aca cat ggt caa ttt ttc tct att ttg ccg att tat gat tca 336
Pro Leu Thr His Gly Gln Phe Phe Ser Ile Leu Pro Ile Tyr Asp Ser
100 105 110

ggt gga tac tta gag aaa gtg tat caa act gct aaa tcg gta gaa gcc 384
Gly Gly Tyr Leu Glu Lys Val Tyr Gln Thr Ala Lys Ser Val Glu Ala
115 120 125

caa acg ttc cac gat gcg att tgt gcc ctt atc gta gaa gag ctg ttt 432
Gln Thr Phe His Asp Ala Ile Cys Ala Leu Ile Val Glu Glu Leu Phe
130 135 140

gaa tat gca ggc aaa tgg cgt aat att cgt gtg caa gga ccg aca aca 480
Glu Tyr Ala Gly Lys Trp Arg Asn Ile Arg Val Gln Gly Pro Thr Thr
145 150 155 160

ttt cta cca tcc ttg act gta cag gta gca atg gca ggt gcc atg ttg 528
Phe Leu Pro Ser Leu Thr Val Gln Val Ala Met Ala Gly Ala Met Leu
165 170 175

att ggt ctg cat cat cgc atc tgt tat acg acg agc gct tcg gtc tta 576
Ile Gly Leu His His Arg Ile Cys Tyr Thr Thr Ser Ala Ser Val Leu

180

185

190

act gaa gca gtt aag caa tca gat ctt cct tca ggt tat gac cat ctg 624
Thr Glu Ala Val Lys Gln Ser Asp Leu Pro Ser Gly Tyr Asp His Leu

195

200

205

tgc cag ttc gta atg tct ggt caa ctt tcc gac tct gag aaa ctt ctg 672
Cys Gln Phe Val Met Ser Gly Gln Leu Ser Asp Ser Glu Lys Leu Leu

210

215

220

gaa tcg cta gag aat ttc tgg aat ggg att cag gag tgg aca gaa cga 720
Glu Ser Leu Glu Asn Phe Trp Asn Gly Ile Gln Glu Trp Thr Glu Arg

225

230

235

240

cac gga tat ata gtg gat gtg tca aaa cgc ata cca ttt 759
His Gly Tyr Ile Val Asp Val Ser Lys Arg Ile Pro Phe

245

250

<210> 11

<211> 253

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 11

Met Asn Gly Pro Ile Ile Met Thr Arg Glu Glu Arg Met Lys Ile Val

1

5

10

15

His Glu Ile Lys Glu Arg Ile Leu Asp Lys Tyr Gly Asp Asp Val Lys

20

25

30

Ala Ile Gly Val Tyr Gly Ser Leu Gly Arg Gln Thr Asp Gly Pro Tyr

35

40

45

Ser Asp Ile Glu Met Met Cys Val Met Ser Thr Glu Glu Ala Glu Phe

50

55

60

Ser His Glu Trp Thr Thr Gly Glu Trp Lys Val Glu Val Asn Phe Asp

65

70

75

80

Ser Glu Glu Ile Leu Leu Asp Tyr Ala Ser Gln Val Glu Ser Asp Trp

85

90

95

Pro Leu Thr His Gly Gln Phe Phe Ser Ile Leu Pro Ile Tyr Asp Ser

100

105

110

Gly Gly Tyr Leu Glu Lys Val Tyr Gln Thr Ala Lys Ser Val Glu Ala

115

120

125

Gln Thr Phe His Asp Ala Ile Cys Ala Leu Ile Val Glu Glu Leu Phe

130

135

140

Glu Tyr Ala Gly Lys Trp Arg Asn Ile Arg Val Gln Gly Pro Thr Thr

145

150

155

160

Phe Leu Pro Ser Leu Thr Val Gln Val Ala Met Ala Gly Ala Met Leu

165	170	175
Ile Gly Leu His His Arg Ile Cys Tyr Thr Thr Ser Ala Ser Val Leu		
180	185	190
Thr Glu Ala Val Lys Gln Ser Asp Leu Pro Ser Gly Tyr Asp His Leu		
195	200	205
Cys Gln Phe Val Met Ser Gly Gln Leu Ser Asp Ser Glu Lys Leu Leu		
210	215	220
Glu Ser Leu Glu Asn Phe Trp Asn Gly Ile Gln Glu Trp Thr Glu Arg		
225	230	235
His Gly Tyr Ile Val Asp Val Ser Lys Arg Ile Pro Phe		
245	250	

【 0 0 3 2 】

【配列表フリーテキスト】

配列番号 1 : Staphylococcus aureusのKNT遺伝子に変異を導入し、これを発現して得られた変異型酵素

配列番号 2 : Staphylococcus aureusのKNT遺伝子に変異を導入し、これを発現して得られた変異型酵素

配列番号 3 : Staphylococcus aureusのKNT遺伝子に変異を導入し、これを発現して得られた変異型酵素

配列番号 4 : P C R増幅用 5' -プライマー

配列番号 5 : P C R増幅用 3' -プライマー

配列番号 6 : P C R増幅用 5' -プライマー

配列番号 7 : WT*のサブクローニング用 5' -プライマー

配列番号 8 : KT3-11及びHTKのサブクローニング用 5' -プライマー

配列番号 9 : サブクローニング用 3' -プライマー

【図面の簡単な説明】

【図 1】

プラスミド pYK134 (a)、pTT8 (b)、及び pJHK1 (c) の各制限酵素地図を示す図である。

【図 2】

KNTの熱安定性を示す図である。

(A) WT* (□)、KT3-11 (△)、HTK (○) の熱変性は、222nmのCDをモニターし、記録した。測定条件は、蛋白濃度 $0.8 \mu\text{M}$ で 0.1M KClを含む 50mM リン酸カリウムバッファー pH7.0である。

変性度 (%) = $(\theta_{222}^T - \theta_{222}^N) / (\theta_{222}^D - \theta_{222}^N)$
 (θ_{222}^T は $T^\circ\text{C}$ 、222nmにおける平均残基分子橢円率、 θ_{222}^N 、 θ_{222}^D はそれぞれ未変性及び変性酵素の222nmにおける平均残基分子橢円率を示す。)

(B) 熱不活性化。酵素溶液は、指示温度で10分間加熱される。冷却後、 25°C で活性を測定する。熱処理は、タンパク質濃度 $1.2 \mu\text{M}$ でCD測定と同じバッファー中で行われた。それぞれの酵素への値は、非加熱処理酵素と比較した比活性で表した。それぞれの数値は、 $\pm 10\%$ の偏差値を有する。

【図 3】

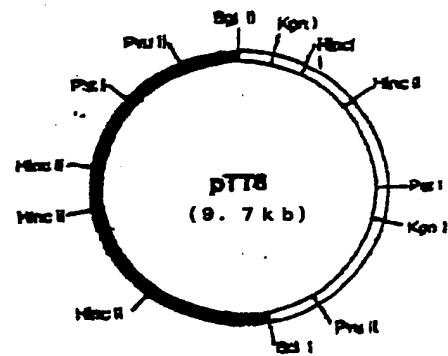
Asp80Tyr変異を有するKNT(KT3-11及びHTK)の構造の3次元表示を示す図である。KNTは、ホモダイマーであるが、変異残基の位置と残基番号は、一方のサブユニットのためのみに示してある。KT3-11の変異残基、HTKの追加9変異残基、カナマイシン、ATPアナログであるアデノシン5'- α, β -メチレントリホスフェートを表示した。この図はMOLSCRIPT (Per Kraulis, Department of Molecular Biology, Uppsala University, Sweden) を使って製作した。

【図4】

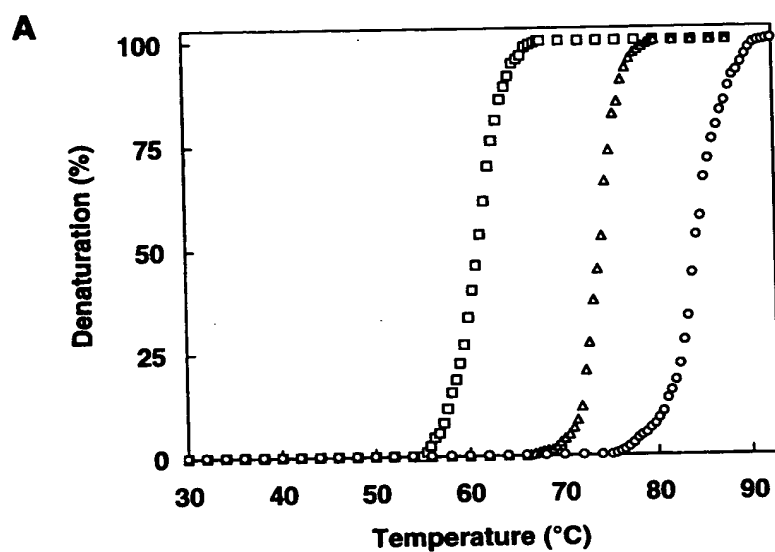
プラスミド pJHK3の制限酵素地図を示す図である。

【図 1】

(B)



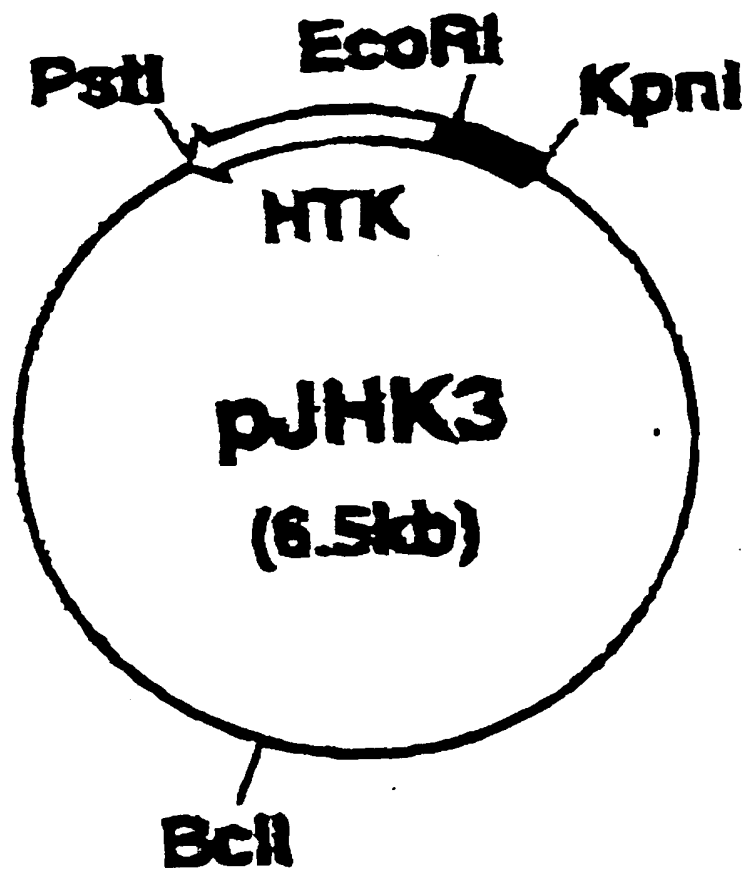
【図 2】



B

Enzyme	Residual activity (%) after heat treatment		
	60°C	72°C	80°C
WT*	5	0	0
KT3-11	100	5	0
HTK	100	100	15

【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 極端な pH で安定であり、容易に結晶化し、取り扱いやすいゆえに、酵素の構造と機能の相関を研究する良い研究材料として有用である *Thermus thermophilus* 等の好熱菌において好適な選択マーカーを得る。

【解決手段】 熱安定性を顕著に向上させた新規なカナマイシンヌクレオチジルトランスフェラーゼ及びこれを利用した選択マーカー、並びに該選択マーカーを用いた好熱菌のスクリーニング方法を提供する。

【選択図】 図 2

出願人履歴情報

識別番号

[000006792]

1. 変更年月日	1990年 8月28日
[変更理由]	新規登録
住 所	埼玉県和光市広沢2番1号
氏 名	理化学研究所